

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

SULFATED POLYSACCHARIDE DS 4152 AND VASCULARIZATION INHIBITOR AND ANTITUMOR AGENT CONTAINING THE SAME

Patent Number: JP63119500

Publication date: 1988-05-24

Inventor(s): INOUE KAZUKIYO; others: 03

Applicant(s): DAI ICHI SEIYAKU CO LTD

Requested Patent: JP63119500

Application Number: JP19870125443 19870522

Priority Number(s):

IPC Classification: C07K15/14; A61K31/725; A61K37/02; C08B37/00; C12P19/04

EC Classification:

Equivalents: JP2544136B2

Abstract

NEW MATERIAL: A sulfated polysaccharide DS 4152 having the following physical and chemical properties. Molecular weight, 29,000+ or -3,000; elemental analysis (%), C 24.42-25.76, H 3.34-3.98; N 0.51-0.89, S 10.6-11.7, P 0.77-1.06; sugar content, 57+ or -3; protein content, 1+ or -0.5; specific rotation, $[\alpha]D<25>=-37+$ or -1 deg. (0.5% aqueous solution); main IR absorption band, 1,240, 840 (shoulder), 810 (cm^{-1} ; KBr); solubility, easily soluble in water and almost insoluble in organic solvents such as ether, benzene, chloroform, methanol, ethanol, etc.; pH, 6-8 (3% aqueous solution); etc.

USE: A vascularization inhibitor and antitumor agent. The activity can be promoted when combined with a steroid drug.

PREPARATION: For example, pyrogenic substance, etc., having a molecular weight of $>=15\times10^4$ are removed by a proper molecular weight fractionation method from DF 4639 separated from a cultured product of *Arthrobacter* sp. AT (FERM P-5255).

Data supplied from the esp@cenet database - I2

1988

① 日本国特許庁 (JP) ② 特許出願公開
 ③ 公開特許公報 (A) 昭63-119500

④ Int.CI.
 C 07 K 15/14
 A 61 K 31/725

登別記号 厅内整理番号
 ABL 8318-4H
 ABY 7252-4C※審査請求 未請求 発明の段 5 (全13頁)

⑤発明の名称 硫酸化多糖体 DS 4152並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤
 ⑥特 権 昭62-125443
 ⑦出 権 昭62(1987)5月22日
 ⑧优先権主張 ⑨昭61(1986)5月23日⑩日本(JP)⑪特願 昭61-118847
 ⑫発明者 井上 和弘 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内
 ⑬発明者 田中 紀子 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内
 ⑭発明者 是永 博 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内
 ⑮出願人 第一製薬株式会社 京都市中央区日本橋3丁目14番10号
 ⑯代理人 弁理士 有賀 三重 外2名
 最終頁に続く

明細書

グラクトース類似)

| | |
|--|---|
| 1. 発明の名称 | 蛋白含量(%) : 1±0.5 (ローリー・フォーリン法、牛血清アルブミン標準) |
| 硫酸化多糖体 DS 4152 並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤 | |
| 2. 特許請求の範囲 | (1) 比旋光度 |
| (i) ナトリウム塩として下記の物理化学的性質を有する硫酸化多糖体 DS 4152。 | (a) $\alpha_D^{20} = -37^\circ \pm 1^\circ$ (0.5%水溶液) |
| (ii) 分子量(ゲルろ過法による) | (b) 紫外線吸収スペクトルに示ける主要吸収波長 $1240, 840$ (肩), 810 (m^{-1} ; λ_{max}) |
| (iii) 29000±3000 | (c) 溶解性 |
| 3. 元素分析値 | 水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム、メタノール、エタノール等の有機溶媒には殆ど不溶。 |
| C 24.42~26.76% N 3.34~3.98% | |
| H 0.61~0.69% S 1.00~1.17% | (d) 色色反応 |
| P 0.77~1.06% | フェノール-硫酸、アンスロシ-硫酸、ピュレット反応およびローリー・フェリン反応 |
| 4. 成分および蛋白質の含量 | |
| 蛋白含量(%) : 57±3(フェノール-硫酸法、 | |

は陽性。水溶液のエルソシン・ペルガシ反応とビニンヒドリン反応も陽性。カルバソール反応および波ロ反応は陰性。

(ii) 酸性、中性、碱性的区别

pH 6~8 (3% 水溶液)

(iii) 糖成糖かおよび双缩脲、銀の含量

ローダルコース、ローガラクトース、 20.1% チミジック(糖)の含有モル比はローダルコースを1.0としてそれぞれ約1.0:0.1:7.3:0である。

四 氨酸アミノ酸およびアミノ酸

既知水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シアンアミノピメチジン酸、グルコサミンおよびムクミン酸の存在を認める。

特開昭63-119500(2)

2. 保液化多糖体 DS-4152 を有効成分として含有する血管新生抑制剤。

3. リューマチ性関節炎、増殖性網膜炎、肥厚、糖尿病性網膜炎、未熟児網膜症に有効な特許技術の範囲第2項記載の血管新生抑制剤。

4. 保液化多糖体 DS-4152 を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

5. 保液化多糖体 DS-4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

6. ステロイドが糖質コルチコイド類、液体ポリマー、エストラン酸及びアンドロスタン酸から選ばれたものである特許技術の範囲第6項記載の血管新生抑制剤。

7. リューマチ性関節炎、増殖性網膜炎、肥厚、糖尿病性網膜炎、未熟児網膜症に有効な特許技術の範囲第5項記載の血管新生抑制剤。

水の範囲第5項記載の血管新生抑制剤。

2. 保液化多糖体 DS-4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する抗腫瘍剤。

3. 見明の詳細を説明

(臨床上の利用分野)

本発明は、既成を保液化多糖体 DS-4152 並びにこれを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤並びにこれと共にステロイド剤を含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤に關する。

(従来の技術及びその問題点)

従来、ミクロコッカスの ATCC-25 の芽胞生産物中に腫瘍抑制作用、感染防御作用およびインターフェロン誘導作用を有する保液化多糖体 DS-4030 が存在することが知られて

いた(特開昭56-67301号、特開昭57-42627号および特開昭59-25329号)。

本発明者らは、既々の有用性の期待される保液化多糖体 DS-4030 について生物学的特性を明らかにすべく検討をかこなつた結果、DS-4030 が強い見急性を有することを知つた。

(問題を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、この見急性を有せずすべく、更に研究をかこなつていたところ、DS-4030 は、いくつかの成分の混合物であり、そのうちの DS-4152 と名づけられた一成分は見急性がなく、しかも優れた血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用を有することを見出した。

特開昭63-119500 (3)

更にまた、本発明者は、このDS-4152とステロイド剤とを組合せると血管新生剤作用及び抗腫瘍作用が相乗的に増強されることを見出した。

本発明は、上記の如見に古くものであり、その目的は、新規を炭化多糖体DS-4152を提供するものである。

また、本発明の他の目的は、炭化多糖体DS-4152を有効成分として含有する血管新生剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

更に、本発明の他の目的は、炭化多糖体DS-4152とステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

本明細書中の「血管新生剤」とは、既の

児童、実体形成、創傷の治癒等に用ひて宜焉なだけでなく、調節リューマチを含む慢性炎症、免疫亢進、結核等の病的状態についてもその肉体の成長に深く関与している血管の新生作用を認めたことをいう。したがつて、血管新生剤には、上記血管の新生作用が関与する糖尿病、例えばリューマチ性關節炎、増殖性網膜炎、皮膚、糖尿病性網膜炎、未熟児網膜症等の治療、予防に有用なものである。特に盛んに古い血管新生を促し、新生された血管より供給される血液がさらに血管の増殖と成長を促進するとされているので、抗腫瘍剤としても有効である。

本発明の炭化多糖体DS-4152は、アルスロバクター AT-25 (工業技術院生

物工業技術研究所には、Microtiter plate SP-AT-25として、FERM P-5295及びArthrobacter sp. AT-25としてFERM SP-133570の番号で寄託されている)の培養物から分離されるDF-4639(特開昭60-67301号参照)から、その中に含まれる分子量約 1.5×10^4 以上の異常性物質等を適当な分子量分画法、例えばゲルろ過法や膜ろ過法、アルコール沈殿法で除くことによつて得られる。

すなわち、アルろ過法によればDF-4639を適当なゲルろ過媒体、例えば、セファタリル(Sephadex G-300(フアルマシア製))を用いてゲルろ過を行い、得られるフラクションについて高速ゲルろ過クロマトグラフィ

ー(東洋ソーダ製G3000 SWカラム使用)を行い、波数域(ペイド・ペリューム、void volume)にピークを示すフラクション(右側)とペイド・ペリュームにピークを示す分子量約 $2 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ の範囲に溶出されるフラクション(左側)を各々集め、濃縮する。

また、膜外透析は適当な膜(例えばAmico社製のYM10、YM30、XM50、PM30やMillipore社製のNOVA100、OMEGA100、NOVAGO、OMEGAGO等特にYM10)を用い、窒素ガスによる加圧またはペリストリッタ(peristaltic)ポンプによつて加圧(0.5~5psi/cm²程度)し、透過液をDS-4152として認めればよい。使用溶媒は、水-エタ

ノール(10:2~3)または水が適当であり、4℃乃至室温で行なうのが一般的である。

得られた各過程内液を最終後ろ通し、ろ液を数倍量のエタノール中に攪拌下注ぐことにより生成する白色沈澱を集め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗つた後、減圧乾燥すれば、目的とするDS 4152(七割分)と発熱性物質(三割分)が各々得られる。

こうして得られるDS 4152は以下に述べる物理化学的特性を示す。下記の物性はセロナトリウム塩についてのものである。

(1) 分子量(アルカリによる)

29000±3000

(2) 元素分析値(2.0g/molを示す)

カルシウム、マグネシウム、エタノール等の有機溶媒には殆ど不溶。

(3) 黑色反応

フェノール-硫酸、アンスロシン-硫酸、ビニレント反応およびコー-リー-フォーリン反応は陽性。水溶液のエルソン・モルガン反応およびエニヒドリン反応も陽性。カルバゾール反応および坂口反応は陰性。

(4) 増量性、中性、酸性の区別

pH 6~8(3%濃度水溶液)

(5) 水溶性シルビウム塩、銀の含量

0-グルコース、0-ガラタース、SO₄²⁻を1.0としてそれぞれの10:6.1:7.3:6である。

特開昭63-119500(4)

C 24.42~25.76% H 3.34~3.98%

N 0.51~0.89% S 1.06~1.27%

P 0.77~1.06%

(6) 銀シルビウム塩の含量

銀含量(%) : 5.7±3(フェノール-硫酸法、ガラタース法)

銀白含量(%) : 1±0.5(コ-リー-フォーリン法、牛血清アルブミン標準)

(7) 比旋光度

(a)_D²⁵ -37°±1°(0.5%水溶液)

(8) 紫外吸収スペクトルにおける主要吸収帶
1240, 840(弱), 610(α⁻¹; β_{2,3})

(9) 鹽解性

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホ

(10) 酸成アミノ酸シルビウム塩

強加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、ジアミノピメリジン酸、グルコサミンシルビウム塩の存在を認め。

以上DS 4152は、後記実施例で示す如く、单独でも血管新生抑制作用を有するものであるが、ステロイド類と組合せることにより、更に優れた血管新生抑制作用を示す。

尚、本発明の血管新生抑制剤においては、DS 4152の代りにヘパリン、低分子ヘパリン等を使用することもできる。

従来、アレドニゾロン、コロ-メチルアレドニゾロン、デキサメタゾン等のステロイドホルモンが、局麻鎮痛剤、見赤薬、ヘムステ

一頭目で実験的に説明された血管新生を抑制する作用を有することが報告されている

(Cancer Res. 30 1308 (1970) J. Nissl.

Cancer Res. 31 769 (1971) 及び Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 78 1170 (1981))。

また、ステロイドホルモンのうち、雄性ホルモン（アンドロスタン、アンドロジン、ベタメナゾン等）は白血病、悪性リンパ腫、乳癌、前立腺癌の治療に使用されている。

更に、アンドロスタンを母核とする男性ホルモンであるテストステロンプロピオニート、フルオキシメスチロン等が抗乳酸症薬として用いられており、20~30%の有効率が得られると報告されている (Obstetica 10 72 (1984))。

ソロンか及びその関連体（アセテート、ヘミタクシネット、フォスファート、アカルアセテート、ナトラヒドロフタレート、トリメチルアセテート等）；メチルアンドロジンか及びその関連体（アセテート、ヘミタクシネット等）；ベタメナゾンか及びその関連体（フォスファート、メレレート等）が挙げられる。

また、グルココルチコイドOC-11位の水酸基が記述になつた異性体（たとえば、11α-エピヘイドロコートソン）も含まれるし、前記グルココルチコイドのナトラヒドロ代謝物（グルココルチコイド固形の有無は明記しない）も含まれる。

更に、女性ホルモンであるプロゲスチロン、

特開昭63-119500 (5)

更にまた、プロゲスチロンの関連体、テストステロンの関連体か及びエストロジニンが前立腺癌の治療に用いられている。

前記のO-4152と組合せ用いることでのるステロイド類は、雄性ホルモン、女性ホルモン類、エストラン類及びアンドロスタン類等であり、より具体的には次のものが示される。

(1) アンドロジンを母核とするステロイドホルモン、すなわちグルコルチコイドであり、たとえばコートソンか及びその関連体（アセテート、エナンチート、ウンデシレート等）；ヘイドロコートソンか及びその関連体（アセテート、ヘミタクシネット、カブロエート等）；アンドロジンか及びその関連体；アンドロ

ドロキシプロゲスチロンか及びその関連体（アセテート等）、ダイドロゲストロンか及びその17α-アセトキシ関連体（デュフェストン）等があげられる。

更にまた、ミネラルコルチコイドであるアルドステロン、デソキシコルチコステロンか及びその関連体（アセテート、トリメチルアセテート、エナンチート、フェニルプロピオニート等）もあげられる。

(2) アンドロスタンを母核とするステロイドホルモン、すなわち、男性ホルモンであり、たとえば、アンドロステロン、テストステロンか及びその関連体（プロピオニート、エナンチート、ブチレート、カブリレート等）が示される。また、エピテオスターノールか及び

その酵素体、ミピナオスタンがあげられる。さらにフルオキシメスチロンかおよびその酵素体、メタルテストロンかおよびその酵素体、エタノロンかおよびその酵素体も含まれる。

(ii) エストランセホルンとするステロイドホルモン、すなわち、初期ホルモンであり、たとえば、エストロンかおよびその酵素体、エストラジオールかおよびその酵素体(ベンゾエート、シプロピオネート、パレレート、クンダセノエート等)、エストリオールかおよびその酵素体(トリプロピオネート等)があげられる。

本発明の血管新生剤剤の用法としては、有効成分を医学的に許容される量体、葉形剤を含有する種々の形態、例えば次または各種の複数用剤に溶解させた液剤、散剤、膏剤

である。性別による投与の場合は通常経口の1/3量が適量である。

また、本発明の血管新生剤剤を経皮筋用として用いる場合の投与方法及び用量も、ほぼ上記と同じである。

(発明の効果)

本発明のDS-4152はそれ单独でもつても血管新生剤作用を有するが、これを更にステロイド剤と組合せるとより強れた血管新生剤作用を有する。

したがつて、DS-4152单独でもつても血管新生剤用として有用であるが、更にステロイド剤と組合せたものは相乘的に作用が増生されるので、例えば腫瘍血管の新生を抑制し、癌の増殖を防ぐ血管新生剤用として特

特開昭63-119500(6)

用、緩用、注射用、塗用等が挙げられる。

本発明の血管新生剤剤がDS-4152とステロイド剤とを含有するものである場合、これらをそれぞれ別個に上記用型の單用に調製して組合せ用とすることも、あるいは両成分を含む合用とし調製化することもできる。

本発明の血管新生剤剤は、肺膜内、膀胱内、経口、皮下、直腸内、粘膜内または直腸周囲内に投与することができる。その投与量は、成人の経口一日量で、DS-4152として1~2000mg程度であり、ステロイド剤は男性ホルモン剤、細胞コルチコイド剤で10~1000mg、通常30~60mgが適量で、漸減していくのが好ましいことがある。プロゲステロン剤では100~1200mgが適量

に有用なものである。

(実施例)

次に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。

実施例1(1)

特開昭56-67301号に記載の方法により得られたDP-4639(30g)を1.5mlの0.1M NaClに溶解し、これを0.1M NaClで平衡化したカラム(セファクリル3-300; 30×80cm)にかけて同原液にて浮出し、1.8mlずつ浮出液を集めた。得られたフラクションについて高速アルドロマトグラフィー(波長ソーダ線 93000 SWカラム、溶媒0.1Mの塩カリウム緩衝液pH 6.9)を行い、ダイド・ドクターマニピュータを用ひ、

特開昭63-119500(7)

DS 4152 の物理化学的性質および生物学的性質を DS 4639 およびその E 百分と比較して示す。

(4) 糖、蛋白、ミクミク含量(第1表)

第1表:

| | 1) 糖(%) | 2) ミクミク(%) | 3) 蛋白(%) | 4) E(%) |
|---------|------------|---------------|-------------|------------|
| DS 4152 | 56 | 1.11 | 1.1 | 0.88 |
| DS 4639 | 54 | 1.08 | 1.3 | 0.86 |
| E 百分 | 42 | 1.29 | 1.6 | 0.72 |

1) フエノール-硫酸法(ガラクトース換算)
2) アントノラクタスの方法(C.A. Antenosolase, *Acta Chem. Scand.*, 16, 1521(1962))による

3) ローリー-フォリン法(牛血清アルブミン換算)

4) チエンらの方法(P.S. Chien et al., *Anal. Chem.*, 28, 1756(1956))による。

(5) ガラクトース、グルコース、アラビノシトロハヌミンの構成モル比

液体を 1 植定温度中 100℃ で 5 時間加水分解しイオン交換樹脂で脱塩処理した後、常法によりアルカリトールアセテートとしてガスクロマトグラフィーで分析した。また、脱塩蛋白と構成モル比は、ミクミクの含量(%)から算出した。

第2表

| | ガラクトース | グルコース | アラビノシトロハヌミン | 蛋白 |
|---------|--------|-------|-------------|-----|
| DS 4152 | 61 | 10 | 23 | 0.6 |
| DS 4639 | 62 | 10 | 23 | 0.6 |
| E 百分 | 62 | 10 | 29 | 0.6 |

第2表は、グルコースを 1.0 モルとした場合

各の各成分のモル比の一例である。

(6) 構成アミノ酸とアミノ酸の同定

DS 4152 を 3 植定温度中、100℃ 1.5 時間加水分解した後、常法によりアミノ酸分析計にて分析した結果、アラニン、グリシン、グルタミン酸、ジアミノピメリン酸、グルコナミン酸およびムラミン酸のピークを認めた。

(7) 比旋光度: $(\alpha)_D^{20} (+=0.5, \text{水})$

第3表

| | 比旋光度 |
|---------|------|
| DS 4152 | -37 |
| DS 4639 | -36 |
| E 百分 | -34 |

(8) ゲルろ過溶出パターン

第1図、第2図および第3図に、それぞれ

DS 4152, DP 4639 および EPOXY の混合
ゲル戻りクロマトグラムを示す(実験ソース
試料 3000 mg カラム使用、溶媒 0.1 N
酢酸カリウム緩衝液、流速 0.9 ml/min、
標準物質テキストラン T-100 および T-40)。

(4) 紫外線吸収スペクトル

280 / 340 nm にかけて 320 ~ 340 nm
に極大吸収は認められない。

(5) 紫外線吸収スペクトル (ESR 調)

1240, 840 (弱) および 810 cm⁻¹ K, 実
験化多糖に特徴的な吸収を示す。

DS 4152 の構造としては、主として 2-

ガラタースとローダルコースから成る糊質
部分によるミクロン級フォスフェートを介して
アラドグリカン部の結合した複合化多糖体で

特開昭63-119500 (8)

ると推定される。

(1) 発癌性試験

日本薬局方(第10改正)に準じて行った
発癌性試験の結果を第4表に示す。

以下余白

(1) DS 4152 の急性毒性(マウス、静注)は、
LD₅₀が 2000 mg/kg 以上であるった。

実験例 1 (1)

DP 4639 (40 g) を 300 ml のエタノール (10 : 3) 溶液に溶解し、TM10
膜 (4.2 cm², アミコン社製) を用いて、室
温で加圧 (1.5 kg/cm²) 下、室温で脱水戻
し。上記溶液を追加しながら透過液量が
約 3 L となるまで実施した。透過程の濃縮液
(約 50 ml) に 100 mg の酢酸ナトリウムを
加えて溶解した後、透心分離により得られる
上清を約 500 ml のエタノール中へ投げ下層
下した。生成した沈殿を集め、90% エタノ
ール、エタノール、アセトンの順に洗つた後、
減圧乾燥 (55 °C, 5時間) して DS 4152

| 試験 | 1 | 1 | + | + | + | + |
|----------|---------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 溶媒 | 水 | 0.1 N 酢酸カリウム 緩衝液 |
| 用具 ml | 75 | 75 | 75 | 75 | 75 | 75 |
| 体積 | DS 4152 | DP 4639 | DP | 混合 | | |

の白色粉末を得た。

このものの物理化学的性質は、次に示す通り、
蛋白、S及びPの含量を求め、実験例1(1)の
DS 4152と同一であった。

蛋白含量 56%

S含量 11.3%

蛋白含量 46%

P含量 0.92%

高速ゲル干過クロマトグラムを第4図に示す(0.3000 SWカラム、0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(Ph 6.8)、0.8ml/分)。

実験例2

高圧沈降管血管新生阻止試験(直接法)：

屠獲を用い、ナイラーとフォーマン

(Nature 207: 307, (1982)) の方法を一

べた。ステロイドとしては、酢酸コートソンを0.8μg/ ml屠獲の量(血管新生に影響のない量)用いた。また、比較として、DP 4639及びE固分についてもその活性を調べた。この結果を第5表に示す。

第5表

50%血管新生阻止量(ID₅₀ 値)

| | DS 4152 | DP 4639 | E固分 |
|-------------------------------|---------|---------|-----|
| ID ₅₀ 値 (μg/屠獲) | 3 | 30 | 600 |

実験例4

実験例2と同様な方法で、各種ステロイドとDS 4152の併用によるID₅₀ 値の変化を検討した。この結果、図4のステロイドIC₁₀

特開昭63-119500(9)

と比較した以下の方法で行った。

屠(ノーリングロス)の4~5日飼育後
の屠獲液に、生理食塩水で稀釈したり DS 4152
又はペパリンを添加し、37°Cで増殖した。

屠物添加2日後に、深層膜血管の発達度を
生理食塩水のみを添加した対照と比較し、ア
ロビット法により、50%血管新生阻止量
(ID₅₀ 値)を算出した。

この結果、本実験のDS 4152のID₅₀ 値
は、100μgでもあった。これに対し、ペ
パリンは、100μgでも作用を示さなかつた。

実験例3

高圧沈降管血管新生阻止試験(直接法)：

実験例2と同様にして、ステロイドと

DS 4152を併用した場合の効果について調

べた。DS 4152を加えれば、それぞれの屠
獲高壓沈降管血管新生阻止活性が1.6~100倍
に増加することが明らかとなつた(第6表)。

第6表

| ステロイド | ID ₅₀ 値(μg/屠獲) | |
|----------------------|---------------------------|-------------------|
| | 単独 | DS 4152(併用) 倍率 |
| コーナンシアセテート | 120 | 0.17 (71倍) |
| ハイドロコートソン | 110 | 0.16 (69) |
| プレデュヨン | 130 | 0.08 (163) |
| 6α-メチルプレデュヨン | 115 | 0.03 (383) |
| ベタクサン | 0.80 | 0.05 (160) |
| テトラハイドロ | 100 | 0.01 (1000) |
| プロゲステロン | 102 | 0.49 (21) |
| メトロキシプロゲステロン アセート | 112 | 0.42 (27) |
| 17β-エトロジオール | 100 | 0.28 (70) |
| フルオキシメスチロン | 124 | 0.12 (103) |
| 5α-アンジロスタン | 232 | 0.29 (8) |

実験例5

血管新生阻止作用(0.01%液)：

Ds 4152 を生理食塩水に溶解し、ICR 不
規マクスに皮下もしくは経口で投与し、6時
間後に血液を採取した。0.313%タエン酸
ナトリウムで凝固を阻止し、遮離法と同様に
5日飼養用硝酸銀試葉に添加し、2日後判定
した。この結果を第7表に示す。

第7表

| 投与ルート | 投与量 (mg/kg) | 血管新生阻止率 (%) |
|-------|----------------|----------------|
| 経口 | 3 | -30 |
| | 30 | 264 |
| | 300 | 627 |
| 皮下 | 3 | 16 |
| | 30 | 328 |
| | 300 | 661 |

第8表

| 投与ルート | Ds 4152 | Ds 4630 | 差額% |
|-------|---------|---------|------|
| 皮下 | 922% | 833% | 888% |
| 経口 | 927% | 848% | 828% |

Ds 4152 および Ds 4630 は経口、皮下
いずれの経路によつても末梢血管新生を抑
制することが認められた。

実験例6

血管新生阻止作用(0.01%液)：

ICR不規マクスに、生理食塩水に溶解した
Ds 4152 を経口投与した。ステロイドは、
Ds 4152 と共にまたは単独で、生理食塩水
に溶解して経口または筋肉内投与した。
投与6時間後に採血し、0.313%タエン

封筒印63-119500(10)

この結果から明らかのように、用量依存的
な血管新生抑制作用が認められた。

実験例7

血管新生阻止作用(0.01%液)：

実験例5と同様にして、ステロイドと
Ds 4152 を併用した場合の効果について考
べた。ステロイドとしては、豚臍コートゲン
を5mg/kgの割合で用い、Ds 4152 は30
mg/kg又は300mg/kgとなるよう調整して
加えた。また、比較と CDP 4630 及び其
百分比を用いた。この結果を第8表に示す。な
く、表中の数値は、生理食塩水を同量投与し
た对照マクスより採取した血液を基準とした
末梢血管の発達度を100%とした時の阻止
率である。

豚ナトリウムで凝固を阻止し、これを遮離法
と同様に5日飼養用硝酸銀試葉に加え、2日後
に血管新生に及ぼす効果を判定した。結果は、
同量の生理食塩水のみを投与したマクスの、
6時間経過後の血液を加えた場合の末梢血管
の発達度を对照とし、阻止百分率で示した。
この結果は第9表の通りである。

以下余白

羽高田63-110500(11)

実施例8

試験結果:

DS 4152/0速マクスに同系の組成由来水濃度 $\times 5070 \pm 1 \times 10^4$ 個皮下接種し、3日目よりDS 4152を30mg/41日1回週の回数下投与したところ、著明な試験物体重と生存日数の有意な延長が認められた。すなわち第10日に示すように各組21日日の重量平均重量は対照群の37% (0.3%抑制) であり、かつメティアノン生存日数が対照群より33%延長した。

・重量平均重量は、被験物の長崎と对照の大きさを測定し、以下の式から求めた。

$$\text{重量平均重量} = (\text{長崎}) \times (\text{对照}) : \times \frac{1}{2}$$

実施例9

試験結果:

ICR系雄マクス(5週齢)にアルコール160(g/160)を 1×10^4 個皮下接種し、3日目より即座コーテゾンの生理食塩水溶解液を250mg/kg/日の場合で3日間、100mg/kg/日の場合で1日投与した。

DS 4152は生理食塩水に溶解し、0.6mlもしくは0.1ml/kgマクスとなる様1日1回皮下もしくは腹腔にて4日間投与した。各組7日目に屠殺して最終重量を対照と比較したところ第10日に示す如く即座コーテゾンのみを投与した群では最終重量は生理食塩水投与群と差がなかったが、さらにDS 4152を投与することにより重着生増殖阻止作用が明らか

| 試験名(ルート) | DS 4152投与量 | | 全管所生菌止率 (%) |
|-----------------|-------------|-------------|----------------|
| | (mg/kg/160) | (mg/kg/100) | |
| コーザンチャーテー(1.0m) | 0 | 30 | 27 |
| アトランバードロス(1.0m) | 1 | 30 | 78.1 |
| エビタキスター(1.0m) | 0 | 30 | -2.0 |
| | 0 | 30 | 71.7 |
| | 0 | 30 | -12.9 |
| | 0 | 30 | 60.7 |
| | 0 | 30 | 4.0 |
| | 0 | 30 | 62 |
| | 0 | 30 | 18.4 |
| | 0 | 30 | 23.4 |
| | 0 | 30 | 24.2 |
| | 0 | 30 | 37.0 |
| | 100 | | |

| 試験名 | 対照群 | | 最終重量(r/cc)(%) | 最終重さ (%) |
|-------|------------------------|-------------|----------------|-------------|
| | 対照群 (kg) | 対照群 (kg) | | |
| MB070 | DS 4152 投与群 R545 | 0 | 230±0.18 (100) | 0 |
| | | 30 | 0.9±0.005 (97) | 2.3 |

01(メチルアルコール生存日数/片側的メティアノン生存日数-1)×100
02(即座コーテゾン生存日数/片側的メティアノン生存日数-1)×100

九、刃先部の吸着量は0.0～12.5%であつた。

表11表

| 処理 | 吸着量 | |
|-------------------------------------|---------------|--------------|
| | 平均吸着量 mg/g | T/c% |
| 生理食塩水(+) | Q381± Q191 | 1000 1000 |
| 生理食塩水(++) | Q391± Q122 | 1000 1000 |
| 防腐コートゾン | Q340± Q162 | 942 942 |
| Ds 4152 (diam/mesac +) | Q381± Q070 | 1000 1000 |
| Ds 4152 (diam/mesac ++) | Q281± Q077 | 723 723 |
| Ds 4152 (diam/mesac +) +防腐コートゾン | Q063± Q018 | 125° 125° |
| Ds 4152 (diam/mesac ++) +防腐コートゾン | Q028± Q011 | 74° 74° |
| Ds 4152 (diam/mesac ++) | Q322± Q071 | 824 824 |
| Ds 4152 (diam/mesac ++) | Q398± Q115 | 948 948 |
| Ds 4152 (diam/mesac ++) +防腐コートゾン | Q063± Q036 | 161° 161° |
| Ds 4152 (diam/mesac ++) +防腐コートゾン | Q038± Q016 | 60° 60° |

*P<0.05, **P<0.01 テストペーパーによる

図面No.3-119500(12)

実験例10

試料用：

Ds 4152 6mg, 乳酸300mg, トクモ
コシデンアン144mg, カルボキシメチルセ
ルロースカルシウム30mg及びヒドロキシア
セピルセルロース20mgを用い、常法に従つ
て500mlの測定用を調製した。この測定用
は液状にもかかわらず800.0mg～81を用い
する。

実験例11

試料用：

Ds 4152 1.2mg, 塩化ナトリウム90
mgを測定用滅菌水に用い、1.0mlとする。
この溶液をメンブランフィルターで戻過した
後、アンプルに充填し、115℃で30分間

放置し使用用とする。

実験例12

試料：

Ds 4152 6mg, アレドニゾン20mg,
乳酸50mg, トクモコシデンアン135mg,
カルボキシメチルセルロースカルシウム5mg,
ヒドロキシアルセピルセルロース3mg及びステ
アリン酸マグネシウム0.5mgを常法に従つて
混合、打鍛し、1袋とする。

4 図面の簡単な説明

図1図ないし図4図は高速ゲル戻過クロマ
トグラムである。

以上

図1図

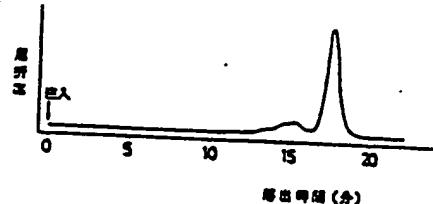
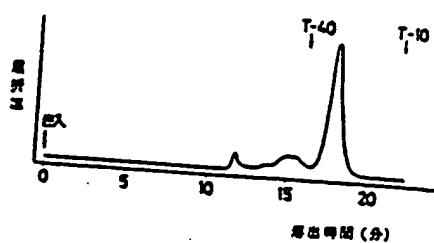


図2図



特開昭63-119500 (13)

図3図

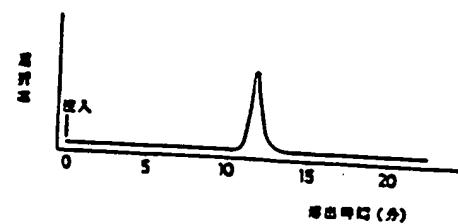
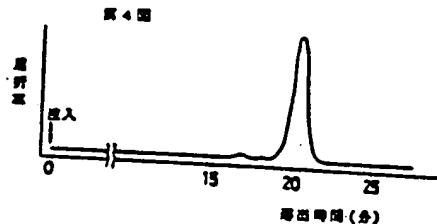


図4図



第1頁の続き

④Int.Cl.
A 61 K 31/723
37/02
C 08 B 37/00
C 12 P 19/04
II(A 61 K 31/723
31:56)

規定記号 場内整理番号
ADU 8615-4C
ABE 6779-4C
C-8515-4B
7252-4C

⑤発明者 小河 秀正 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内